



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**QUÍMICA CLICK EN EL DISEÑO Y DESARROLLO DE
PEPTIDOMIMÉTICOS ANTIBACTERIANOS**

Autor: Nerea Jiménez Montero

Fecha: 30 Junio 2020

Tutor: María Teresa Ramos García

ÍNDICE

CONTENIDOS

ÍNDICE	2
RESUMEN	3
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4. QUÍMICA CLICK: DEFINICIÓN Y REACCIONES.....	5
4.1. CICLOADICIÓN ALQUINO-AZIDA MEDIADA POR COBRE (CuAAC)	6
5. TRIAZOLES: CARACTERÍSTICAS E IMPORTANCIA BIOLÓGICA	8
6. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	9
7. QUÍMICA CLICK EN EL DISEÑO DE PEPTIDOMIMÉTICOS	11
8. CONCLUSIONES	20
9. BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

En 2001 surge el concepto de Química Click como un método de síntesis que permite generar uniones C-heteroátomo a partir de moléculas con determinados grupos funcionales. Estas reacciones son sencillas, eficaces, con rendimientos elevados y pueden llevarse a cabo en medio fisiológico. La reacción modelo y a su vez la más utilizada es la reacción CuAAC: un nuevo método de síntesis que al hacer reaccionar una azida terminal con un alquino terminal utilizando Cu (I) en cantidades catalíticas, permite la generación de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos. Los triazoles son heterociclos aromáticos pentagonales que han demostrado ser útiles en una enorme variedad de compuestos con aplicaciones en distintas áreas de la química médica. Una de las principales características de los triazoles es que se comportan como bioisómeros de las amidas, además de ser altamente estables a procesos de degradación y oxidaciones.

La resistencia a antibióticos ha requerido la atención de muchos científicos en los últimos años. Cada vez son más las bacterias que no responden a los tratamientos existentes, por lo que buscar una solución a este problema es esencial. Los peptidomiméticos anfílicos catiónicos aparecen como una muy buena alternativa a antibióticos convencionales. Son moléculas anfílicas que imitan a los péptidos naturales producidos por organismos pluricelulares como defensa a una infección. Sin embargo, su principal problema es su baja estabilidad y su rápida degradación metabólica al administrarse de manera exógena. Es por esto que la reacción CuAAC y su generación de triazoles se consideran como una muy buena alternativa en la generación de peptidomiméticos: al sustituir un enlace amida por el grupo triazol aumenta la estabilidad metabólica, y además permite unir la parte hidrófoba e hidrófila a través del grupo triazol, lo que facilita enormemente su síntesis y su obtención.

ABSTRACT

In 2001 the concept of Click Chemistry arises as a synthesis method that allows the generation of C-heteroatom bonds from molecules with certain functional groups. These types of reactions are simple, effective, with high yields, and can be carried out in a physiological environment. The model reaction, which is also the most used one, is CuAAC reaction: a new synthesis method that when reacting a terminal azide and a terminal alkyne in the presence of Cu (I) as a catalyst, generates 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituted. Triazoles are pentagonal aromatic rings that have proven to be useful in a wide variety of compounds in the field of medicinal chemistry. One of the main advantages of these compounds is their behaviour as amide bioisomers, as well as being highly stable to metabolic degradation or oxidation processes.

Antibiotic resistance has become a major concern in the last years amongst scientific community. More and more bacteria are not responding to current treatments, so looking for a solution to this problem is essential. Peptidomimetics appear as a good alternative to conventional antibiotics. They are amphiphilic compounds that imitate natural peptides produced by pluricellular organisms as a defense against infections. Nevertheless, their main problem is their low stability and its rapid metabolic degradation when administered exogenously. This is why CuAAC reaction and triazoles are considered as a great alternative to solve these problems: by replacing an amide bond by the triazol group, the metabolic stability increases. Moreover, it allows linking the hydrophobic and hydrophilic part of the molecule, which facilitates its synthesis and enables its production.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial de los conocimientos relacionados con las ciencias farmacéuticas. El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, así como el mejor conocimiento de la fisiopatología de muchas enfermedades, ponen de manifiesto la necesidad de nuevos fármacos. Continuamente surgen nuevas moléculas que se estudian con el fin de obtener compuestos que puedan ser utilizados en distintas patologías. A su vez, se proponen nuevas rutas sintéticas para poder acceder a estos potenciales fármacos o modificarlos, ya que la necesidad de obtener moléculas seguras y eficaces es cada vez mayor.

Como respuesta a estas necesidades surge el concepto de “*Química Click*” o “*Click Chemistry*”, propuesto por Sharpless et al, en 2001, como una serie de criterios que identifican reacciones capaces de generar rápidamente una gran variedad de compuestos, con mínimo impacto en la salud humana y en el medio ambiente. La química click es un método de síntesis mediante el cual se puedan formar moléculas a través de enlaces carbono-heteroátomos (C-X-C). Se trata de una aproximación modular, es decir, a partir de un conjunto de “bloques” o estructuras, unas reacciones químicas que sean selectivas, potentes y modulares, pueden ser utilizadas a pequeña y gran escala de manera fiable para obtener una gran variedad de nuevos compuestos (1).

La reacción de cicloadición entre azidas y alquinos para originar triazoles ha adquirido una gran importancia en la química orgánica, especialmente a raíz del desarrollo de la reacción catalizada por cobre CuAAC, ya que es la que mejor representa las características de la Química Click. Su relevancia se debe a que este nuevo método de síntesis conduce de manera regioselectiva y con buenos rendimientos a producir derivados de 1,2,3-triazol-1,4-disustituidos.

Además, los triazoles son estructuras que han demostrado tener una enorme importancia en distintas áreas de la ciencia, y están presentes en productos de interés farmacéutico como antitumorales, antibacterianos, anti-VIH, herbicidas, antifúngicos... (2).

Hoy día, la Química Click es una herramienta muy útil en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Atendiendo a esto, se puede utilizar la química click en el diseño de nuevos fármacos para tratar infecciones producidas por bacterias resistentes, bien como nuevos antibacterianos, o bien como “inhibidores de la resistencia” en terapia de combinación para restablecer la eficacia de antibióticos, ya que actualmente la resistencia a antibióticos es más frecuente, y es un problema que afecta a nivel mundial.

2. OBJETIVOS

Con este trabajo de revisión bibliográfica se pretende actualizar y recopilar los conocimientos que se tienen sobre la reacción de cicloadición entre alquinos y azidas catalizada por cobre y denominada CuAAC, y destacar las características que la han convertido en uno de los métodos más importantes para la síntesis de nuevos compuestos en diferentes áreas. Igualmente se destacará su importancia y contribución como metodología para el diseño y síntesis de nuevos compuestos buscando resolver uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, la resistencia a antibióticos, mediante la síntesis de peptidomiméticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se basa en una búsqueda bibliográfica de artículos científicos, revistas y páginas web de organismos oficiales sobre la química click, y en concreto sobre la reacción CuAAC en distintas bases de datos, como PubMed, ScienceDirect y Google Académico. La mayor parte de la bibliografía ha sido publicada en los últimos 10 años. Las palabras claves utilizadas en la búsqueda han sido “formación de triazoles a partir de la reacción CuAAC”, así como “triazoles con propiedades antibacterianas”. Las palabras utilizadas han sido: “1,2,3-triazol”, “Click Chemistry”, “CuAAC” “Peptidomimetics”.

4. QUÍMICA CLICK: DEFINICIÓN Y REACCIONES

La Química Click es una aproximación sintética que se basa en el uso de un conjunto de reacciones químicas que permiten unir mediante enlaces C-heteroátomo moléculas portadoras de gran variedad de grupos funcionales. De esta forma, con reacciones sencillas y eficaces, se pueden generar una gran diversidad de fármacos potenciales, y así acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Las reacciones Click deben tener las siguientes características (1):

- La reacción debe ser de alcance general y tener rendimientos elevados con una gran variedad de materiales de partida.
- Los subproductos que se generen deben ser inofensivos y fácilmente eliminables evitando técnicas cromatográficas.
- La reacción debe ser altamente estereoespecífica.
- Las condiciones de reacción deben ser simples, e idealmente el proceso de síntesis no debe verse alterado por la presencia de oxígeno y agua.
- Los materiales de partida deben ser fácilmente disponibles.
- Idealmente no se usaría ningún disolvente, y en caso de usarlo deberá ser un disolvente que no produzca efectos adversos en el organismo (como por ejemplo el agua) o que sea de fácil eliminación.
- Aislamiento del producto final sencillo.

Las reacciones que cumplen los criterios para ser consideradas click pueden clasificarse principalmente en cuatro grupos dependiendo del mecanismo de reacción (1) (3) (Figura 1):

- **Apertura nucleofílica de anillos tensionados.** Son las reacciones en las que hay apertura de heterociclos electrófilos, como por ejemplo, aziridinas, epóxidos...
- **Reacciones de cicloadición.** Se produce la formación de un ciclo.
 - Cicloadición entre alquinos y azidas catalizada por cobre (CuAAC: Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition).
 - Cicloadición entre alquinos y azidas en ausencia de cobre (SPAAC: strain-promoted azide-alkyne cycloaddition).
 - Cicloadición de hetero-Diels-Alder (iEDDA: inverse-electron-demand Diels-Alder).
- **Reacciones no aldólicas de grupos carbonilos.** Como resultado de estas reacciones se forman ureas, tioureas, hidrazonas, oximas...
- **Reacciones de adición a enlaces múltiples C-C.** Como la epoxidación.

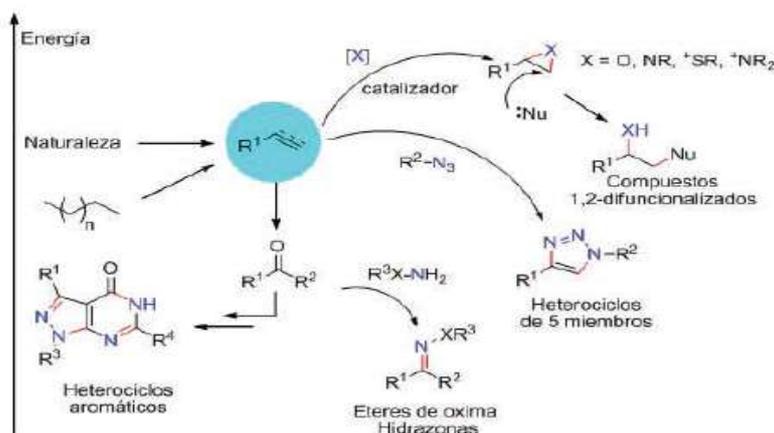


Figura 1. Química Click: reacciones de formación de enlaces C-heteroátomo (3).

Otro aspecto importante a destacar es que estas reacciones tienen una termodinámica favorable, en la mayoría de los casos superior a 20 kcal/mol. Son procesos rápidos e irreversibles, y enormemente selectivos para un único producto. Por estas características se denominan “spring-loaded reactions” (1).

Se ha observado que muchas reacciones de la Química Click transcurren mejor en agua que en disolventes orgánicos, por lo que este tipo de reacciones pueden trasladarse a condiciones fisiológicas. Por tanto, tienen infinitas aplicaciones, como la modificación de biomoléculas, liberación de fármacos, síntesis de fármacos in situ, bioimagen, marcadores biológicos... (1).

4.1. CICLOADICIÓN ALQUINO-AZIDA MEDIADA POR COBRE (CuAAC)

Las cicloadiciones son reacciones que se producen al unir dos reactivos insaturados, y cuyo resultado es la formación de una enorme variedad de heterociclos con 5 y 6 miembros, los cuales son los más abundantes en la naturaleza. Es por esto que, en la química orgánica, siempre son bienvenidos nuevos métodos de síntesis de heterociclos.

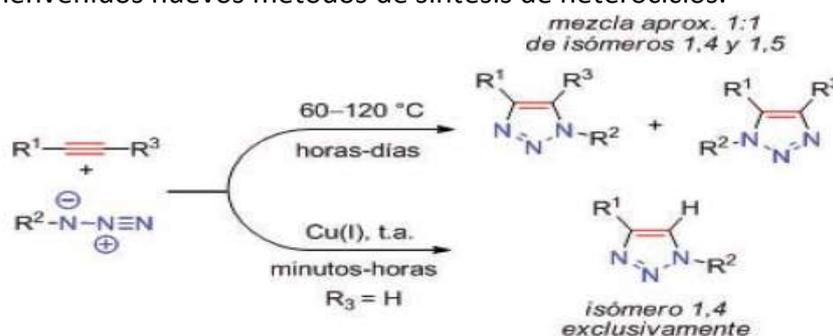


Figura 2. Diferencia entre las condiciones de reacción entre una reacción de cicloadición en ausencia de cobre (arriba) y la reacción catalizada por cobre (abajo) (3).

Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar fueron descritas hace más de 100 años. En 1960, Huisgen volvió a poner este tipo de reacciones en el mapa al describir por primera vez la reacción de cicloadición entre azidas y alquinos terminales para obtener 1,2,3-triazoles. La cicloadición de Huisgen es una cicloadición térmica, ya que requiere calor para la formación del producto (4). Además, en algunos casos se requería un calentamiento muy prolongado, lo que afectaba a la estabilidad de los compuestos. Esta reacción conduce a 1,2,3-triazoles, pero tiene como producto final una mezcla de los regioisómeros 1,4 y 1,5 disustituidos. Es una reacción no regioselectiva, puesto que se forman ambos compuestos (3) (Figura 2).

En 2001, Meldal (5) y Sharpless (1), de manera independiente, describieron cómo la adición de Cu (I) en cantidades catalíticas aportaba dos importantes ventajas sobre la reacción: aumentaba la velocidad de reacción de manera considerable, y además, la reacción tendría como producto final únicamente el isómero 1,4-disustituido. Actualmente es la reacción modelo de lo que se conoce como “Química Click”.

Es decir, la reacción CuAAC entre una azida orgánica terminal (R-N₃) y un alquino terminal tiene como especie catalítica necesaria para que se lleve a cabo la reacción el Cu (I), el cual es rápidamente oxidado a Cu (II) en solución. Esto hace necesaria la presencia de un agente reductor en exceso que pueda reducir Cu (II) a Cu (I). El agente reductor que más se emplea es el ascorbato sódico, generalmente en exceso (entre 3 y 10 veces más). Esta reducción de Cu tiene la ventaja de no requerir una atmósfera inerte para llevarla a cabo. Otros agentes reductores que han demostrado ser útiles en este tipo de reacciones, son la hidracina o la hidroxilamina (6).

Sin embargo, se ha observado que el Cu (I) puede producir la oxidación de residuos de histidina y arginina. Para evitar esto, es necesaria la introducción de ligandos estabilizadores de cobre. De esta forma limitamos la alteración de estos aminoácidos, y a su vez se acelera la velocidad de reacción (6).

Aunque el cobre más utilizado es aquel cuyo estado de oxidación es Cu (II), no es el único que puede emplearse en este tipo de reacciones. El cobre metálico Cu (0) en forma de alambre, en presencia de sales de Cu (II) permite generar iones Cu (I) que actúan como catalizador. Uno de los motivos por los que este no es el método de elección es que el tiempo de reacción es más elevado, además de necesitar un mayor aporte de Cu (II) (3).

Otra técnica que podríamos utilizar sería la adición de sales de Cu (I). Este método es de gran utilidad cuando la reacción tiene lugar en un medio orgánico. Se añaden directamente sales solubles de Cu (I) por lo que no serían necesarios agentes reductores u oxidantes para conseguir ese estado de oxidación. También se añaden al medio bases de nitrógeno como trietilamina o DIPEA. El papel de estas bases no está claro, pero podrían participar estabilizando el estado de oxidación Cu (I) y haciéndolo más resistente a degradaciones por oxidación (3).

Mecanismo de reacción.

A pesar de que es una reacción ampliamente utilizada, su mecanismo todavía no está del todo claro. Aun así, hay un mecanismo propuesto que podría explicar cómo se da la reacción (Figura 3):

Se produce la formación in situ de un enlace de tipo sigma entre el acetiluro y el cobre, formando el acetiluro de cobre (I). A continuación se produce la coordinación de la azida orgánica al complejo anterior, que da lugar a la contracción de un ciclo de 6 miembros para formar un intermedio de reacción más estable, el triazolido de cobre. Posteriormente se produce la unión de un segundo átomo de cobre que actúa como catalizador, el cual se une mediante un enlace de tipo π y se forma el complejo catalíticamente activo. Posteriormente los átomos de cobre se eliminan para que vuelvan a catalizar otra reacción, y se forma un heterociclo de 5 átomos: 1,2,3-triazol, con los sustituyentes en posición 1 y 4 (7) (8).

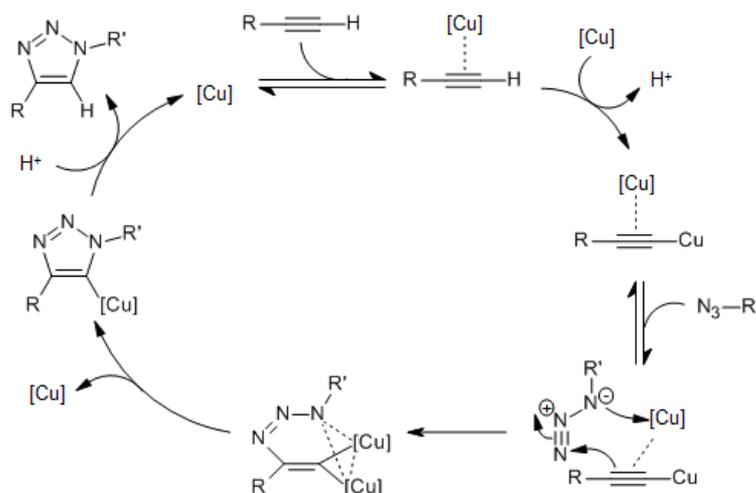


Figura 3. Mecanismo propuesto para la reacción CuAAC (7).

Ventajas de la reacción CuAAC (8).

- Regioselectividad. Una de sus principales ventajas es que es regioselectiva, de manera que solo se forma el derivado 1,4-disustituido. Además, esta reacción tiene lugar, en condiciones suaves, entre $10^6 - 10^7$ veces más rápido que la cicloadición térmica de Huisgen, lo cual favorece que pueda ser llevada a cabo a temperatura ambiente. Estas dos características se deben a la presencia del catalizador, Cu (I).
- Gran selectividad.
- En muchas ocasiones, no es necesaria la purificación del compuesto, por lo que puede ser directamente utilizado.
- Tanto las azidas como los alquinos son grupos funcionales poco reactivos, lo cual favorece que sean inertes en sistemas biológicos, disminuyendo así el número de interacciones y efectos indeseados.
- La reacción se puede llevar a cabo con una gran variedad de disolventes, incluido el agua, lo que la hace idónea en medios biológicos.
- Es una reacción altamente exotérmica, y normalmente no requiere temperaturas elevadas para llevarse a cabo. Esto facilita mucho su utilización a gran escala.
- Los productos formados son altamente estables en condiciones estándar, así como en gran variedad de solventes y pHs, y en distintas condiciones fisiológicas.

La reacción CuAAC representa un método sencillo de generar nuevos fármacos, y se ha propiciado su uso en diversas áreas. Es ampliamente utilizada en el área biomédica, siendo una de las principales herramientas que ahora mismo están siendo utilizadas en la síntesis de nuevas moléculas.

5. TRIAZOLES: CARACTERÍSTICAS E IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Un triazol es un heterociclo aromático pentagonal, con tres átomos de nitrógeno en posiciones 1,2,3 y dos átomos de carbono, y que puede albergar distintos sustituyentes en su estructura. Se dividen en subgrupos: 1,2,3-triazoles monocíclicos, benzotriazoles, y sales de 1,2,3-triazolio, aunque estos dos últimos no se pueden obtener mediante la reacción CuAAC. Los triazoles monocíclicos son estables a la hidrólisis, a condiciones de reducción y oxidación, y a degradaciones enzimáticas (9).

La estructura de triazol ha demostrado tener propiedades similares a un grupo amida en distintas biomoléculas gracias a su elevado momento dipolar. El triazol se comportaría como

bioisómero del grupo amida en la unión de péptidos (Figura 4), anillos aromáticos, dobles enlaces y anillos de imidazol. Además, tienen características únicas como la formación de enlaces de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo, que hacen que tengan una gran importancia en el campo de las ciencias farmacéuticas. Otra ventaja de este tipo de estructuras es que se unen con una gran afinidad a la diana terapéutica debido a su mayor solubilidad, comparada con el enlace amida (9).

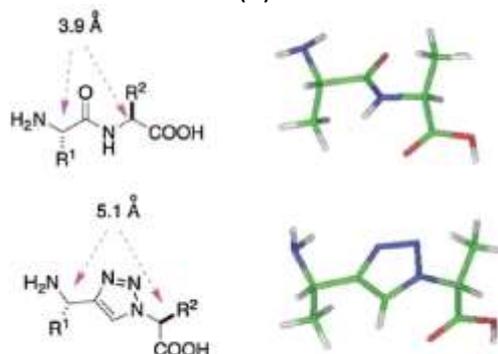


Figura 4. 1,2,3-triazol como bioisómero del grupo amida (9).

Los triazoles son el grupo farmacóforo de una gran cantidad de compuestos distintos, como inhibidores de la COX, antivirales, antibióticos, antifúngicos, antagonistas del receptor CB1 de cannabinoides, antitumorales, antioxidantes... En concreto, los 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos juegan un papel esencial en multitud de compuestos bioactivos: actúan como grupo farmacóforo, participan en la formación de enlaces de hidrógeno o de interacciones hidrofóbicas, forman parte del núcleo estructural de distintas moléculas, estabilizan otros compuestos al mantener su conformación activa e incluso como enlaces entre distintas moléculas (2).

6. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Actualmente, uno de los principales problemas a nivel mundial es la resistencia a antibióticos. Cada vez son menos los antibióticos nuevos en el mercado, y a su vez son más frecuentes las resistencias producidas a antibióticos ya comercializados.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, sin movilidad, y coagulasa positiva del filo Firmicutes. Al observarla al microscopio, podemos ver que las bacterias se agrupan dando lugar a una forma de racimo de uva. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que forma parte de la microbiota de nuestra piel, especialmente de la nariz.

El primer tratamiento contra *S. aureus* fue utilizó la penicilina, pero debido al abuso de los antibióticos, pronto se volvió resistente a esta molécula al producir la enzima β -lactamasa, dando lugar a las cepas PRSA (Penicilin resistant *S. aureus*). La mutación se produce en el gen *mecA* (o en su homólogo *mecC*), que codifica la proteína ligada a penicilina (PBP), concretamente la PBP2a, que es una enzima situada en la membrana citoplasmática de la pared celular, cuya función es ensamblarla. La mutación permite que estas enzimas no sean susceptibles a la acción de inhibidores β -lactámicos y que la pared celular bacteriana crezca con normalidad en presencia de altas concentraciones de metilina (10).

Actualmente, la vancomicina es el fármaco de elección en el tratamiento de las infecciones graves por *S. aureus*. La vancomicina es un glicopéptido que ataca a los residuos de los precursores de peptidoglicanos (11). Sin embargo, empiezan a aparecer resistencias frente a esta molécula mediante la transmisión horizontal (VRSA: Vancomycin-resistant

Staphylococcus aureus) (12). Se producen mutaciones en el gen *vanA*, que participa en la síntesis de la envoltura celular. Esto disminuye la susceptibilidad a la vancomicina (10).

Actualmente, es una de las bacterias que más problemas causa a nivel mundial debido a sus resistencias. Forma parte de las superbacterias ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*), bacterias que son resistentes a antibióticos y que, por tanto, son difíciles de tratar. Las enfermedades producidas por estas bacterias tienen una alta mortalidad y morbilidad. En un estudio llevado a cabo en Europa en 2018, en el norte de Europa las especies resistentes a meticilina eran en torno al 5%, mientras que en el sur de Europa estos datos se sitúan entre el 25-50% de las cepas (12). En concreto, el porcentaje de MRSA en España en 2018 fue del 24,2% (13).

S. aureus penetra en las células epiteliales gracias a unas moléculas denominadas SCRAMM. Es capaz de evitar la fagocitosis al expresar en su superficie proteínas, una cápsula e inhibidores del complemento. Puede sobrevivir dentro de las células que invade, e incluso dentro de macrófagos. Los factores de virulencia se expresan gracias a sistemas reguladores, siendo el principal el AGR. La bacteria produce proteínas autoinductoras que activan genes que contienen factores de virulencia. Además, *S. aureus* puede sobrevivir al sistema inmune del huésped y a antibióticos al pasar a un estado metabólicamente inactivo. Puede causar infecciones no toxigénicas (normalmente en piel y partes blandas) e infecciones toxigénicas (piel escaldada, intoxicaciones alimentarias, síndrome del shock tóxico y neumonía hemorrágica). Las cepas MRSA se pueden tratar con glucopéptidos, (vancomicina, teicoplanina), daptomicina o linezolid (14).

Entre las amplias aplicaciones que tienen los triazoles, una de ellas es su uso como antibacterianos. Actualmente, hay varios fármacos que actúan contra bacterias resistentes a β -lactamasas que contienen un núcleo de triazol en su estructura, como la tazobactama o cefatrizina (Figura 5).

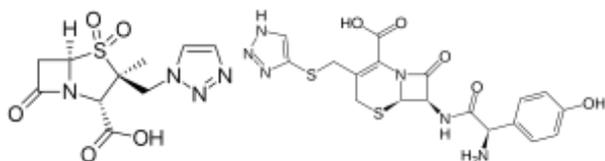


Figura 5. Inhibidores de β -lactamasa: tazobactama y cefatrizina respectivamente.

La tazobactama es un fármaco con acción bactericida y cuya diana terapéutica es la β -lactamasa. Al comparar la efectividad inhibitoria entre la tazobactama con otro inhibidor de la misma familia pero que carecía del anillo de triazol (sulbactama), se observó que la actividad inhibitoria de la tazobactama era mayor. Esto es debido al anillo de triazol, ya que participa en la inhibición de la enzima β -lactamasa al aceptar el anillo de triazol un hidrógeno de un donador de hidrógeno de la enzima, produciéndose un enlace intermolecular. De esta manera el grupo carboxilo puede rotar, y el grupo triazol gira, permitiendo una mejor y más fuerte interacción con la diana (15) (16).

Existen inhibidores de la enzima β -lactamasa que sí pueden ser sintetizados mediante la reacción CuAAC. Son los inhibidores del estado de transición del ácido borónico (BATSIs), y se postulan como uno de los más prometedores inhibidores de la β -lactamasa. Se denominan ácidos 1-amido-2-triazoliletanoborónicos, y se sintetizan mediante la homologación asimétrica de boronatos (permite introducir un carbono con estereocentro en la posición α al ácido borónico) y la reacción CuAAC (16).

El ácido borónico actúa como bioisómero del anillo de lactama. El triazol es una parte fundamental en este tipo de compuestos, ya que tiene varias funciones específicas:

- Sustituye al grupo m-carboxibencil manteniendo el carácter aromático, al comportarse como bioisótero del grupo fenilo.
- Se sintetiza de manera rápida y eficaz, y permite introducir una enorme variedad de sustituyentes en la molécula.
- Actúa como un grupo de unión activo debido a su elevado momento dipolar.
- Se le atribuye un aumento de la actividad inhibitoria de la enzima, al igual que sucede con la tazobactama.

En la Figura 6 se muestra el método de síntesis B, que permite obtener mayores rendimientos y una ruta sintética más eficiente con menos intermediarios de reacción.

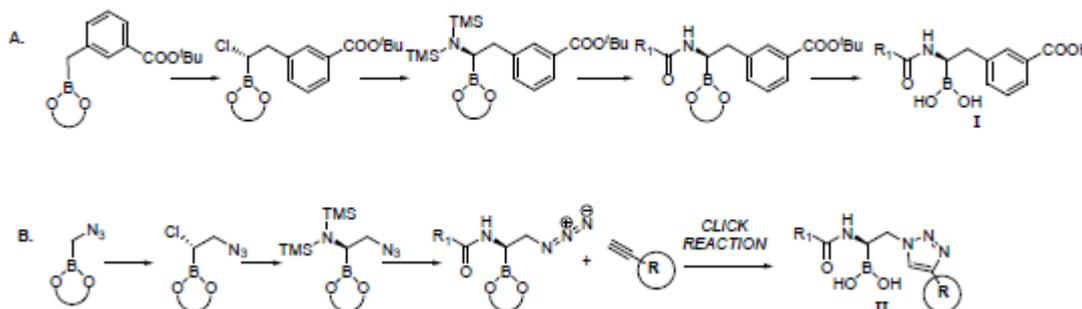


Figura 6. Síntesis estereoselectiva de BATSIs (A) en comparación con el nuevo método de síntesis mediante la reacción CuAAC (B) (16).

7. QUÍMICA CLICK EN EL DISEÑO DE PEPTIDOMIMÉTICOS

La equivalencia bioisostérica entre el anillo de triazol y el enlace amida permite diseñar peptidomiméticos en los que el enlace peptídico sea sustituido por un anillo de triazol. Por ello, la reacción CuAAC se ha utilizado en la obtención de colecciones de peptidomiméticos que muestran gran diversidad estructural, y además son metabólicamente estables a la degradación por las proteasas al carecer del enlace peptídico.

a) Péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos son péptidos endógenos, mayoritariamente catiónicos, son producidos por cualquier organismo pluricelular como mecanismo de defensa contra distintos patógenos (17). Han sido aprobados péptidos antibióticos para infecciones, como la nisina, daptomicina, bacitracina... (18).

Normalmente están formados por entre 10 y 50 aminoácidos y una gran cantidad de residuos hidrofóbicos. Presentan distintas estructuras, como lámina-beta, alfa-hélice (la más común) y péptidos extendidos (17).

Estos péptidos son moléculas anfipáticas, con un extremo de la molécula formado por gran cantidad de residuos hidrofóbicos, y el otro extremo formado por residuos hidrófilos con carga, generalmente positiva (residuo catiónico). Este residuo catiónico produce una interacción electrostática con la membrana bacteriana, la cual está cargada negativamente. Al unirse a la membrana, primero interaccionan con ella los grupos cargados negativamente mediante interacciones electrostáticas. Posteriormente, el péptido se agrega en la superficie de la membrana, y la parte hidrófoba ayuda a su inserción en el interior de la membrana bacteriana (17).

El mecanismo de acción, representado en la Figura 7, consiste en atacar los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana bacteriana. Los AMPs compiten con los iones Mg^{2+}

y Ca^{2+} unidos a los fosfolípidos de la membrana de bacterias Gram negativas, lo que provoca la desestabilización de la membrana y el paso de los péptidos a través de la misma. Una vez que han atravesado la membrana provocan su despolarización y posterior formación de poros. Con esto se consigue una acción bactericida, aunque en determinados casos se puede llegar a producir la muerte celular. En bacterias Gram positivas, la interacción de AMPs se produce con el ácido lipotéico de la membrana celular. Esto provoca la muerte celular, que se consigue mediante la liberación de autolisinas o por la acción directa sobre la membrana citoplasmática al formar poros (17).

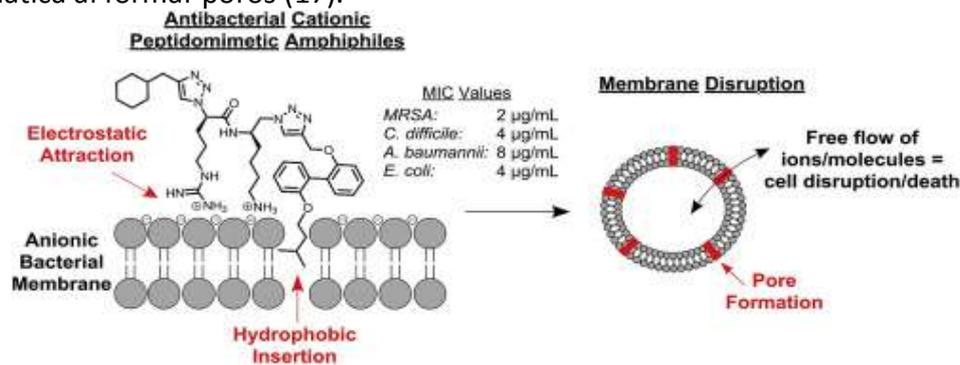


Figura 7. Mecanismo de acción de peptidomiméticos anfifílicos (19).

Los AMPs se consideran una buena alternativa a los antibióticos convencionales, ya que presentan un mecanismo de acción poco específico y su acción antimicrobiana es rápida, por lo que se pensó que era más difícil que las bacterias desarrollasen mecanismos de resistencia. Sin embargo, se ha demostrado que sí se produce resistencia, la cual puede ser constitutiva, inducible o adquirida (17).

- Resistencia inducible: la bacteria reconoce que el AMP está interaccionando con la membrana y activa determinados genes que cambian la conformación de los lípidos de la membrana, impidiendo la interacción.
- Constitutiva: la bacteria posee una resistencia inherente a AMPs.
- Adquirida: transferencia horizontal de genes entre distintas bacterias.

Sin embargo, los mecanismos de resistencia necesitan un elevado gasto de energía para modificar la bicapa lipídica, por lo que aunque los mecanismos de resistencia son posibles, no es favorable que se produzcan. Además, los AMPs actúan a distintos niveles para producir la muerte celular, por lo que esto contribuye a que la aparición de resistencias sea mucho menor que con otros antibióticos (17).

Aunque actualmente se consideran compuestos altamente activos, tienen algunos problemas en cuanto administración: baja biodisponibilidad por vía oral, baja estabilidad metabólica, su producción es costosa, toxicidad in vivo... Por lo que ninguno ha superado ensayos clínicos (17).

b) Peptidomiméticos antimicrobianos.

Como una solución ante estos problemas surge la química click: el objetivo es la creación de una biblioteca de compuestos base que conserven la actividad antimicrobiana, y que a su vez mejoren las propiedades farmacocinéticas que permitan su uso. Además, el grupo triazol que se formará tiene distintas propiedades en los distintos tipos de moléculas sintetizadas (Figura 8) (20).

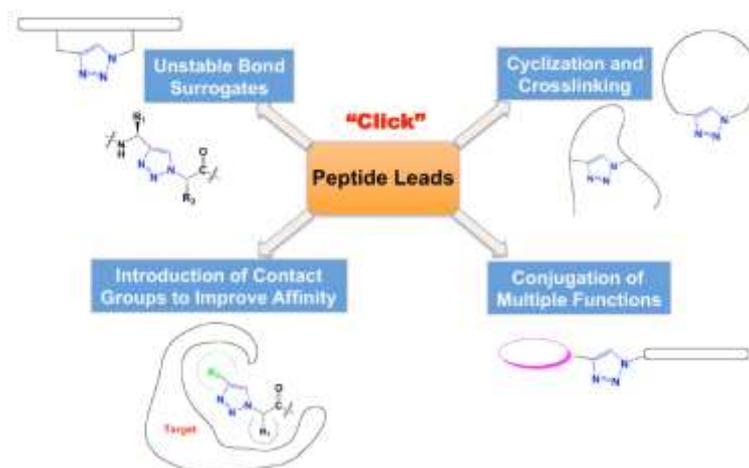


Figura 8. Aplicaciones de la Química Click en el diseño de peptidomiméticos (20).

- **Sustitutos de uniones inestables.** Uno de los principales problemas que presentan los péptidos al ser utilizados como fármacos es la inestabilidad, ya que son fácilmente hidrolizados por proteasas. El papel del 1,2,3-triazol es fundamental, ya que se comporta como un bioisómero del grupo amida.
 - **Ciclación y reticulación para estabilizar la molécula.** Los péptidos tienden a tener una conformación bastante flexible. Es difícil que tengan una estructura rígida y por tanto, un mecanismo de acción bien definido, lo que dificulta su uso como fármacos. La ciclación mediante 1,2,3-triazoles se presenta como una alternativa para el aumento de la rigidez estructural, al mantener la conformación activa de la molécula.
 - **Introducción de grupos de contacto para aumentar la afinidad.** La unión de grupos funcionales en péptidos se considera una muy buena forma de incrementar la diversidad estructural y aumentar la bioactividad. Los 1,2,3 triazoles pueden incorporarse a una molécula y mejorar la unión con su diana al ser una estructura planar. Este tipo de cambios estructurales permite en algunos casos una mayor afinidad e interacción con el receptor.
 - **Bioconjugación de múltiples moléculas.** La bioconjugación consiste en la unión covalente de dos o más moléculas, creando de esta forma bloques que pueden ser bi o multifuncionales, dependiendo de las moléculas que lo compongan. El grupo 1,2,3-triazol permitiría la unión de las biomoléculas entre sí. Esto podría ser útil en la liberación de fármacos (liposomas, dendrímeros, radiomarcaje...)
- c) Síntesis de peptidomiméticos de binaftilo antimicrobianos (19).

Un estudio pretendía conocer la actividad antibacteriana de peptidomiméticos catiónicos de binaftilo. Se buscaba demostrar que peptidomiméticos de menor peso molecular que los péptidos naturales podrían solucionar los problemas de toxicidad y alta degradación metabólica. Los peptidomiméticos sintetizados han presentado una gran actividad con un amplio espectro bacteriano. Además, han sido testados tanto por vía sistémica como por vía tópica en *S. aureus* resistente a meticilina en ratones, así como cepas de *S. aureus* sensibles a penicilina. Se seleccionó el compuesto 1 (Figura 9) que incluye en su estructura el grupo farmacóforo constituido por un núcleo aromático de binaftilo, el cual tiene como sustituyentes residuos tanto catiónicos como hidrófobos, que le confieren el carácter anfifílico a la estructura, necesario para la eficacia antimicrobiana.

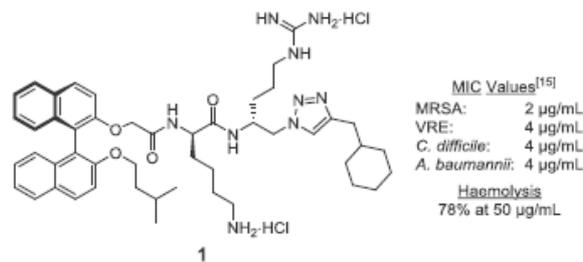


Figura 9. Péptido modelo.

Además, incorpora un anillo de triazol, bioisómero del enlace amida, que hace que la molécula sea resistente a la degradación por proteasas. Utilizando el compuesto 1 como modelo, se realizaron distintas modificaciones estructurales dirigidas a aumentar tanto la solubilidad como la eficacia antimicrobiana en bacterias Gram positivas, como por ejemplo:

- Introducir un segundo anillo de triazol para aumentar la estabilidad metabólica.
- Sustituir el núcleo aromático, cambiando el binaftaleno por biarilo, el cual es más sencillo y menos lipófilo.
- Modificar la longitud y sustituyentes de las cadenas catiónicas e hidrófobas.

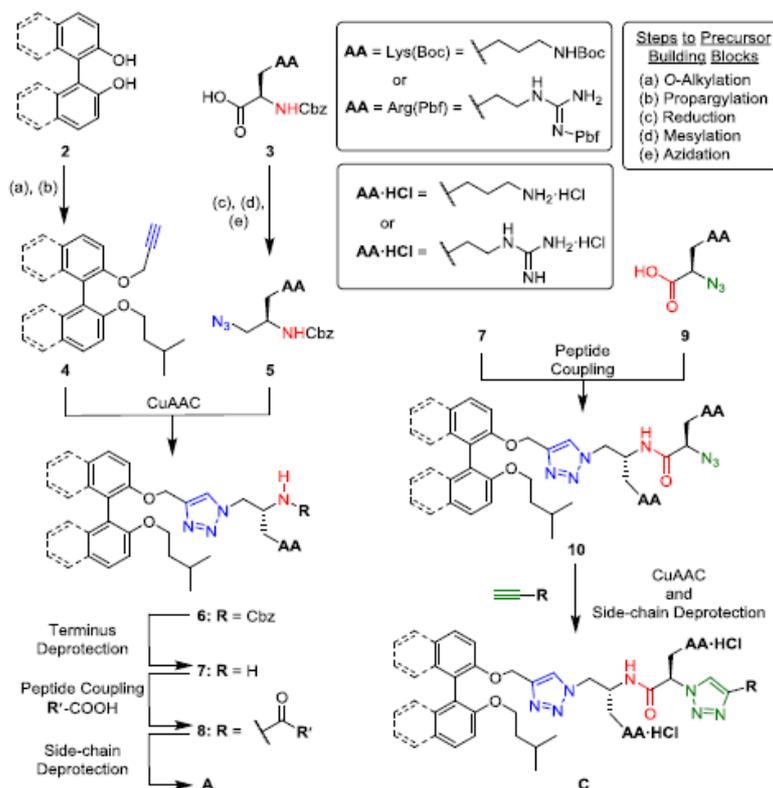


Figura 10. Esquema de síntesis de peptidomiméticos de biarilo.

Haciendo uso de una aproximación sintética modular, se sintetizaron 3 series de peptidomiméticos, combinando una serie de bloques modulares, como aminoácidos modificados, azidas y alquinos y utilizando reacciones sencillas y fiables, como la reacción CuAAC, la cual nos permite unir azidas y alquinos, así como reacciones de acoplamiento peptídico para unir aminas y ácidos carboxílicos (Figura 10).

En total, se obtuvieron 43 biarilpeptidomiméticos, mono- o dicatiónicos. Los restos básicos que a pH fisiológico forman cationes, son las cadenas de los aminoácidos lisina y arginina.

Los compuestos que mejor actividad antibacteriana demostraron de cada serie se muestran en la Figura 11.

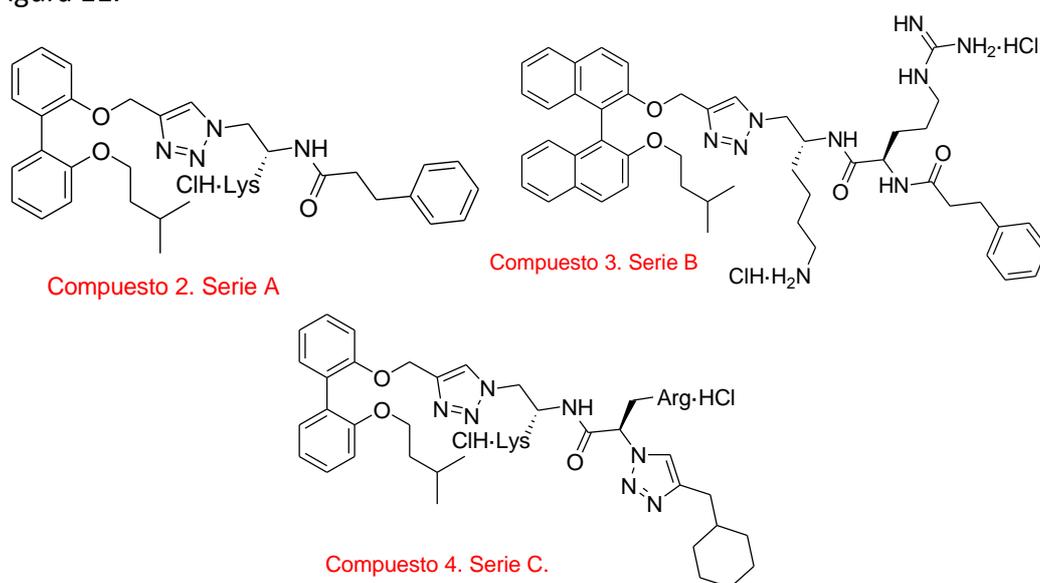


Figura 11. Compuestos con mayor actividad antibacteriana de cada serie.

Los compuestos representados son los que, en cada serie, demostraron tener una mayor eficacia contra *S. aureus*. Se obtuvieron con rendimientos del 93%, 77% y 79% respectivamente.

Compuesto	Rto (%)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	<i>S. aureus</i> NCTC 10442 (MRSA)
2 - Serie A	93	8	16	4
3 - Serie B	77	4	2	4
4 - Serie C	79	4	2	4
Vancomicina	-	-	1	-

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los peptidomiméticos expresada como CMI ($\mu\text{g/ml}$).

Compuesto 2 - Serie A. Es un compuesto monocatiónico al solo tener un aminoácido básico, la lisina, que a pH fisiológico se protona dando lugar a un catión. El residuo hidrófobo está formado por el núcleo aromático bifenilo, ya que en esta serie de compuestos se demostró que grupos muy voluminosos como el binaftaleno disminuyen la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas. Sin embargo, se observó una ligera reducción de la potencia antimicrobiana al sustituir el grupo binaftaleno por el grupo biarilo.

Compuesto 3 - Serie B. En esta serie se estudiaron las propiedades de los compuestos al añadir un segundo residuo catiónico. Todos los compuestos de esta serie tenían en su estructura dos aminoácidos: lisina y arginina, lo cual demostró tener una mayor eficacia antibacteriana contra bacterias Gram positivas que los compuestos monocatiónicos de la serie A. Este hecho se atribuye a una mayor interacción electrostática entre los dos grupos catiónicos y los aniones de la superficie bacteriana. En este caso, no hubo diferencias significativas de eficacia y potencia al modificar la estructura hidrófoba.

Compuesto 4 - Serie C. En la última serie se propuso la síntesis de un segundo anillo de triazol, manteniendo la estructura dicatiónica de la serie B. Se observó que este grupo aumentaba la eficacia en bacterias Gram negativas, pero no suponía una ventaja estructural en eficacia y potencia contra bacterias Gram positivas con respecto a las series anteriores.

Una vez descritas las características y principales moléculas de cada serie, podemos observar una serie de factores comunes entre ellas. La presencia del residuo hidrófobo es esencial para conseguir una elevada potencia antimicrobiana. Se observó que en aquellos compuestos en los que se eliminaba el grupo triazol unido al residuo hidrófobo y se sustituía por una azida terminal, la potencia disminuía entre 2 y 4 veces. En todos los casos el residuo terminal es hidrófobo, ya que un residuo catiónico terminal supone una disminución de la actividad antibacteriana. Además, cuanto más hidrófobo sea este residuo, mayor potencia contra bacterias Gram positivas presenta el compuesto: un radical fenetilo es más potente que un radical bencilo, y un radical ciclohexilmetilo es más potente que el radical ciclohexilo. En cuanto a los residuos catiónicos, tiene una gran importancia su orientación en el espacio. Si introducimos lisina y arginina y posteriormente cambiamos su orden a arginina-lisina, se produce una disminución de la actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas, sin afectar al IMC.

Para los ensayos de despolarización de la membrana se utilizó un compuesto fluorescente catiónico, diSC₃(5), que emite fluorescencia cuando se altera la membrana. El compuesto que actuó como control positivo fue DMSO (aumento de fluorescencia del 90%), y se incrementó entre el 120-180% en la fluorescencia al utilizar los peptidomiméticos. Vancomicina fue el control negativo, ya que no produce fluorescencia al no actuar interrumpiendo el potencial de acción. El compuesto 2 de la serie B mostró los valores de IMC más bajos y la mayor fluorescencia, por lo que se puede deducir que hay una correlación positiva entre la eficacia bacteriana, la capacidad de disrupción del potencial eléctrico y el mayor número de residuos catiónicos.

Para estudiar la permeabilización de la membrana bacteriana se utilizó yoduro de propidio, un compuesto fluorescente que se une al ADN y permite detectar la muerte celular. La fluorescencia se observó con los tres peptidomiméticos. La fluorescencia observada no se relaciona con el IMC, ya que el compuesto 2 generó una elevada fluorescencia en tan solo 10 minutos, pero tiene menor potencia que el resto. El resto de peptidomiméticos necesitaron más de 30 minutos para producir el efecto. Esto nos lleva a pensar que con las moléculas monocatiónicas y pequeñas, es más fácil y rápido permeabilizar la membrana celular.

Como resumen, podemos afirmar que los tres peptidomiméticos demostraron eficacia elevada contra distinta cepas de *S. aureus*. Además, la relación entre los residuos catiónicos/hidrófobos tiene una enorme influencia en propiedades como la actividad antimicrobiana y la selectividad con la membrana, ya que los compuestos dicatiónicos de las series B y C presentaron una mayor eficacia antimicrobiana.

d) Síntesis de peptidomiméticos con triazol como núcleo estructural (21) (22).

Un estudio pretendía evaluar la actividad antimicrobiana de peptidomiméticos cuyo grupo farmacóforo está basado en péptidos de pequeño tamaño encontrados en la naturaleza marina, y que son utilizados por distintos organismos como mecanismo de defensa ante infecciones bacterianas. Para ello se escogieron tres compuestos (Figura 12), los cuales presentan como grupo farmacóforo una parte hidrófoba constituida por anillos de benceno, y una parte hidrófila constituida por grupos amino. Estos grupos amino a pH fisiológico se protonarán dando lugar a residuos catiónicos, y junto a los residuos hidrófobos proporcionarán el carácter anfifílico a la molécula.

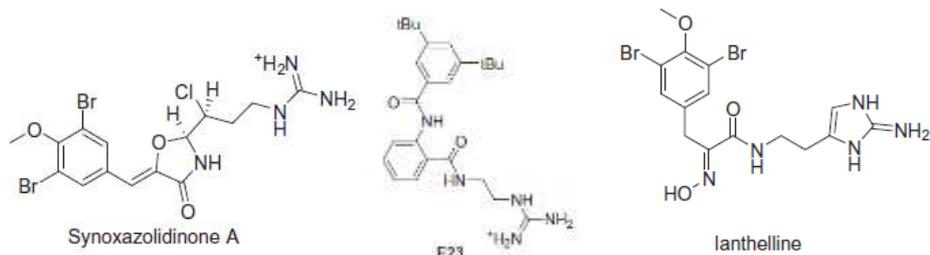


Figura 12. Péptidos naturales marinos y péptido sintético (E23).

A partir de estos compuestos, se diseñaron una serie de moléculas con distintas modificaciones estructurales para observar como varía la eficacia antimicrobiana contra bacterias Gram positivas:

- Sustituir el anillo aromático de la parte hidrófoba por cadenas alifáticas, o introducir distintos sustituyentes sobre el anillo.
- Utilizar distintos derivados de aminas (aminas primarias, aminas terciarias, guanidina) para estudiar cómo afecta la rigidez del residuo catiónico a la estructura.

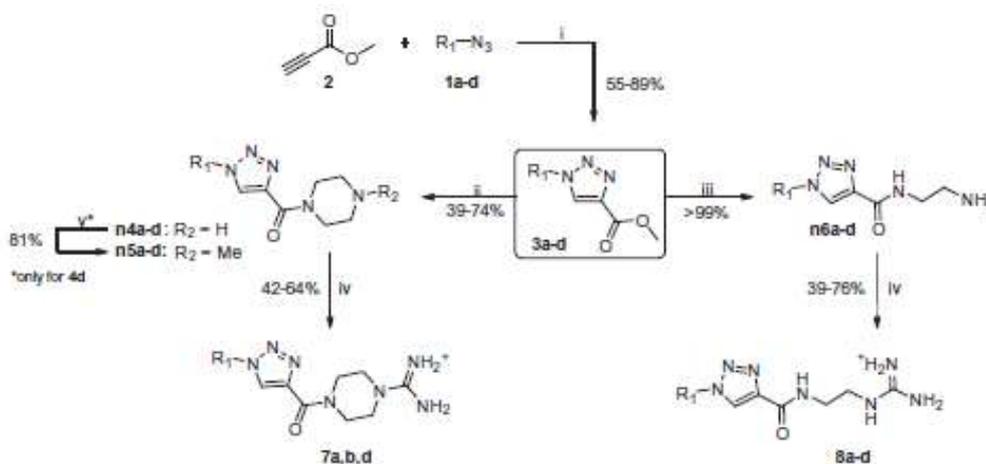


Figura 13. Esquema de síntesis de peptidomiméticos.

Utilizando de nuevo una aproximación sintética modular, se sintetizaron con éxito 19 peptidomiméticos, combinando los bloques modulares de azidas, alquinos y derivados de aminas. Para ello se utilizó la reacción CuAAC (Figura 13).

Los peptidomiméticos poseen carácter anfifílico, y en este caso el grupo triazol actúa como unión entre la parte lipofílica y la parte hidrofílica de la molécula. La azida está unida a la parte lipófila de la molécula, mientras que el grupo alquino está unido a los grupos amino, que a pH fisiológico se ionizarán, dando lugar a residuos catiónicos. De esta manera, la reacción CuAAC permite unir de una forma sencilla la parte hidrófila e hidrófoba de la molécula mediante la formación del anillo de 1,2,3-triazol, que actúa como nexo de unión.

Para la parte lipófila de la molécula se estudiaron distintas estructuras: grupo 3,5-di-t-Bu-bencil, cadena alifática de 7 carbonos, o adamantil con estructura de caja. Los compuestos con una actividad antimicrobiana más potente fueron aquellos cuyo sustituyente era 3,5-di-t-Bu-bencil (Figura 14). De estos resultados se dedujo que la presencia de un anillo aromático y una gran contribución lipofílica era importante en la actividad microbiana.

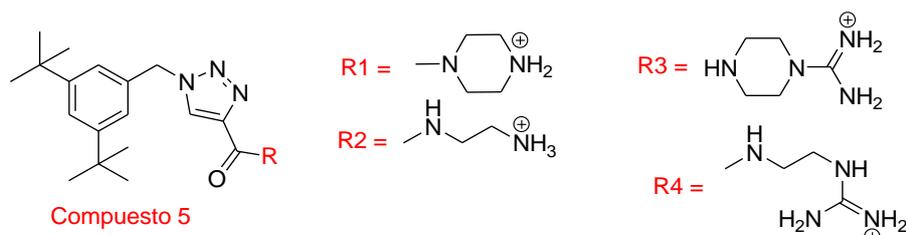


Figura 14. Peptidomiméticos con mayor actividad antimicrobiana.

Partiendo de los resultados anteriores, se observó que el compuesto con el sustituyente R4 era el que más actividad antimicrobiana había desarrollado, por lo que se sintetizó una colección de compuestos partiendo de este. De todos los derivados, el compuesto que más inhibición presentó fue el Compuesto 6 (Figura 15):

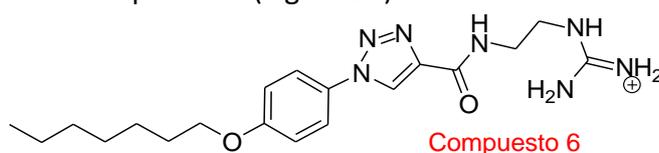


Figura 15. Compuesto con mayor actividad.

El Compuesto 6 mantiene el anillo aromático, el cual es esencial para aportar hidrofobicidad a la molécula. Los sustituyentes fueron modificados, y se sustituyó el grupo 3,5-di-t-Bu-bencil por una cadena alifática de 7 miembros, la cual contribuye a aumentar la hidrofobicidad. Al estar unidos el anillo aromático y el triazol, se produce una repulsión entre los hidrógenos en posición orto del benceno con el anillo del triazol, que hace que la molécula esté fija en una conformación no plana.

Para la parte catiónica se estudió la eficacia de aminas terciarias y primarias, y del grupo guanidina. Se mantuvo el radical guanidina que presentaban los péptidos naturales modelo, ya que se demostró que es el que mayor actividad antimicrobiana posee contra bacterias Gram positivas, incluidas las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y a vancomicina.

Además, se realizó un ensayo in vitro para estudiar la capacidad de producir toxicidad en células humanas HepG2 del compuesto 6. Aquellos compuestos con grupos guanidina presentaron una mayor selectividad a células bacterianas.

Se realizó un segundo estudio utilizando como modelo los péptidos naturales (Figura 12) con un enfoque distinto. En este segundo estudio se buscaba sintetizar péptidos similares a los anteriores pero de menor peso molecular para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los mismos. Las modificaciones estructurales que se llevaron a cabo para conseguirlo son:

- El 1,2,3-triazol-1,4-disustituido sería el núcleo estructural de la molécula sobre el que se construiría el péptido.
- Variación de los sustituyentes hidrófobos para evaluar su actividad antibacteriana.
- Estudiar la efectividad de tres grupos funcionales derivados de aminas.
- Variación de la longitud de la cadena que une el triazol con la parte hidrófoba para estudiar cómo influye en la actividad antibacteriana.

Utilizando una aproximación sintética modular se consiguieron sintetizar 28 peptidomiméticos. Para ello se utilizaron bloques modulares, como azidas terminales con distintos sustituyentes aromáticos que darían lugar a la región hidrófoba de la molécula, y un alquino terminal cuyos sustituyentes son una cadena alifática de longitud variable y derivados del grupo amino que en condiciones fisiológicas darían lugar a la región catiónica. En esta síntesis, el anillo de triazol se sintetiza mediante la reacción CuAAC (Figura 16).

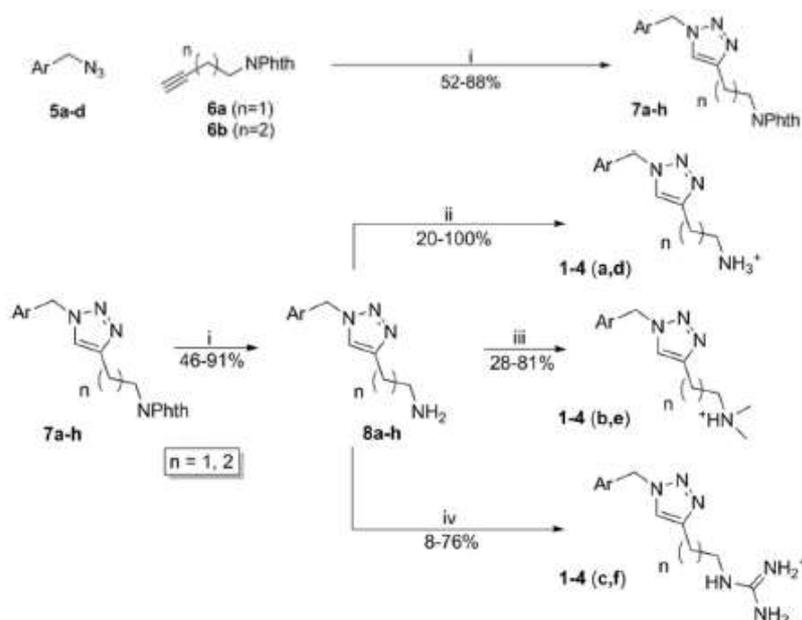


Figura 16. Esquema de síntesis de los peptidomiméticos.

Se introdujeron distintos sustituyentes en la región hidrófila y en la región lipófila para estudiar la efectividad antimicrobiana. El sustituyente azídico que más actividad demostró fue el 3,5-di-t-Bu-fenil, al igual que en el caso anterior, por lo que un sustituyente apolar y voluminoso es fundamental en la estructura del peptidomimético. En cuanto a la parte hidrófila, se utilizaron distintos grupos amino (aminas terciarias y primarias, y grupo guanidina), y al igual que en el caso anterior el grupo con mayor efectividad era la guanidina. Otro parámetro a estudiar fue la longitud de la cadena alifática que une el triazol y el derivado amino. Los compuestos cuya cadena tenía 3 átomos de carbono demostraron mayor actividad que los que presentaban 2 átomos de carbono. Los peptidomiméticos que con mayor actividad fueron los siguientes (Figura 17):

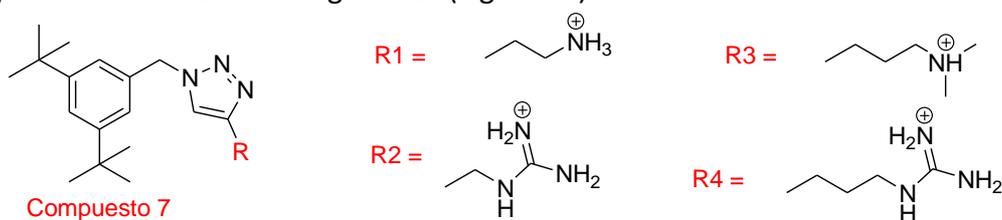


Figura 17. Peptidomiméticos con una mayor actividad antimicrobiana.

El compuesto más activo fue la molécula con los sustituyentes R4. Tiene un grupo hidrófobo voluminoso (3,5-di-t-Bu-fenil), la guanidina como grupo catiónico, y la longitud de la cadena alifática son 3 carbonos. A partir de él se hicieron modificaciones estructurales hasta conseguir el compuesto con mayor actividad (Figura 18):

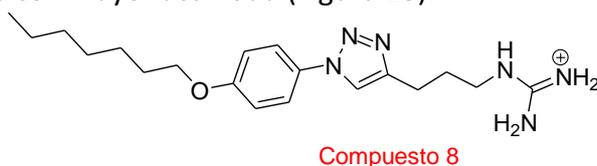


Figura 18. Compuesto con mayor actividad.

Se modificó el sustituyente azídico, sustituyendo la azida bencílica por una azida aromática, por lo que se consiguió una molécula plana con mayor rigidez. Se cambió el sustituyente terc-butil por una cadena alifática de 7 miembros para intentar simular el “efecto snorkel”

que aminoácidos como lisina y arginina producen en la superficie de la membrana. Esto permitió una mejor penetración en la membrana bacteriana.

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Compuesto	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> ATCC 25923
4 R4	32	6 R4	10
5	4	7	4
Gentamicina	0,13	Gentamicina	0,13

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los peptidomiméticos expresada como CMI ($\mu\text{g/ml}$).

8. CONCLUSIONES

- La Química Click es una muy buena herramienta para la síntesis de una enorme variedad de moléculas con aplicaciones en la química médica, ya que permite sintetizar compuestos de una manera fácil y rápida, lo que acelera el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.
- La reacción de cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu (I) (CuAAC) es ampliamente utilizado en la síntesis de fármacos por su facilidad de generación de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos.
- Los triazoles son grupos funcionales con unas características específicas que los hacen útiles en muchas áreas de la ciencia. Su comportamiento como bioisómeros del grupo amida hace que sean una perfecta elección en la síntesis de peptidomiméticos.
- Los peptidomiméticos surgen como alternativa a los antibióticos convencionales, aunque tienen varios problemas cuando se administran. La reacción CuAAC es una muy buena estrategia en la síntesis de estos compuestos al permitir reducir su toxicidad, aumentar su resistencia a la degradación metabólica, mejorar sus características farmacocinéticas y su eficacia antimicrobiana, y permitir una gran variedad de sustituyentes.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2001;40(11):2004-21.
2. Jiang X, Hao X, Jing L, Wu G, Kang D, Liu X, et al. Recent applications of click chemistry in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2019;14(8):779-89. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614910>.
3. Díaz DD, Finn MG, Sharpless KB, Fokin VV. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos. I: Principales aspectos sintéticos. *An Quím.* 2008;(1):8.
4. Suárez A. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre. *Reacciones cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre.* 2012;108(4):306-13.
5. Meldal M, Tomøe CW. Cu-catalyzed azide - Alkyne cycloaddition. *Chem Rev.* 2002;108(8):2952-3015.
6. Pickens CJ, Johnson SN, Pressnall MM, Leon MA, Berkland CJ. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug Chem.* 2018;29(3):686-701.
7. Worrell BT, Malik JA, Fokin V V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science.* 2013;340(6131):457-60.

8. Aragão-Leoneti V, Campo VL, Gomes AS, Field RA, Carvalho I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) «click chemistry» in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron*. 2010;66(49):9475-92.
9. Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem* [Internet]. 2017;71:30-54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>.
10. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 2017;90(2):269-81.
11. Sirijan Santajit, Nitaya Indrawattana. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *PBioMed Res Int*. 2016;2016(1155):1-8.
12. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(May):1-23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.
13. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Internet]. [citado 22 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>.
14. Portillo ME, del Pozo JL. Infecciones por estafilococo. *Med* [Internet]. 2018;12(49):2890-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.002>
15. Toomer CA, Schwalbe CH, Ringan NS, Lambert PA, Lowe PR, Lee VJ. Structural Studies on Tazobactam. *J Med Chem*. 1991;34(7):1944-7.
16. Caselli E, Romagnoli C, Vahabi R, Taracila MA, Bonomo RA, Prati F. Click Chemistry in Lead Optimization of Boronic Acids as β -Lactamase Inhibitors. *J Med Chem*. 2015;58(14):5445-58.
17. Kuppusamy R, Willcox M, Black DSC, Kumar N. Short cationic peptidomimetic antimicrobials. *Antibiotics*. 2019;8(2):1-31.
18. Lobo-Ruiz A, Tulla-Puche J. Synthetic approaches of naturally and rationally designed peptides and peptidomimetics [Internet]. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier Ltd; 2018. 23-49 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00002-8>
19. Tague AJ, Putsathit P, Hammer KA, Wales SM, Knight DR, Riley T V., et al. Cationic biaryl 1,2,3-triazolyl peptidomimetic amphiphiles: synthesis, antibacterial evaluation and preliminary mechanism of action studies. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2019;168(2019):386-404. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.013>.
20. Li H, Aneja R, Chaiken I. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules*. 2013;18(8):9797-817.
21. Bakka TA, Strøm MB, Andersen JH, Gautun OR. Methyl propiolate and 3-butyne: Starting points for synthesis of amphiphilic 1,2,3-triazole peptidomimetics for antimicrobial evaluation. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2017;25(20):5380-95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.060>.
22. Bakka TA, Strøm MB, Andersen JH, Gautun OR. Synthesis and antimicrobial evaluation of cationic low molecular weight amphiphilic 1,2,3-triazoles. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2017;27(5):1119-23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.092>.
23. Rostovtsev V V., Green LG, Fokin V V., Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective «ligation» of azides and terminal alkynes. *Angew Chemie - Int Ed*. 2002;41(14):2596-9. Angell YL, Burgess K. Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem Soc Rev*. 2007;36(10):1674-89.